



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 31/14, 31/40, 31/445, C07D 295/02		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/04252 (43) Date de publication internationale: 5 février 1998 (05.02.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01336 (22) Date de dépôt international: 17 juillet 1997 (17.07.97)		(81) Etats désignés: BR, CA, CN, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 96/09678 31 juillet 1996 (31.07.96) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): VIRBAC S.A. [FR/FR]; 13e rue - L.I.D., F-06517 Carros (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): VIAL, Henri [FR/FR]; 23, rue Pierre d'Auvergne, F-34080 Montpellier (FR). CALAS, Michèle [FR/FR]; 360, rue du Père Prévost, F- 34090 Montpellier (FR). ANCELIN, Marie-Laure [FR/FR]; Chemin des Charretiers, F-34270 Saint Jean de Cuculles (FR). GIRAL, Louis [FR/FR]; 1526, avenue du Père Soulas, F-34000 Montpellier (FR).			
(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).			
(54) Title: ANTIMALARIAL AND ANTI-BABESIOSIS AGENTS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME			
(54) Titre: AGENTS ANTIPALUDEENS ET ANTIBABESIOSES ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT			
(57) Abstract			
Pharmaceutical compositions having antimalarial and anti-babesiosis activity, the active principles of said compositions, and the use thereof for preparing antimalarial drugs, are disclosed.			
(57) Abrégé			
L'invention concerne des compositions pharmaceutiques ayant une activité antipaludéenne et antibabésiose, les principes actifs de ces compositions et leur utilisation dans l'obtention de médicaments anti-paludéens.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**AGENTS ANTIPALUDEENS ET ANTIBABESIOSES ET COMPOSITIONS
PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT**

L'invention concerne des compositions pharmaceutiques ayant une 5 activité antipaludéenne et antibabesiose ainsi que les principes actifs de ces compositions et leur utilisation dans l'obtention de médicaments antipaludéens.

Le paludisme (ou malaria) reste la plus importante des maladies 10 parasitaires qui sévit dans les zones intertropicales. Véritable composante de l'environnement, il constitue l'un des freins les plus puissant au développement de régions immenses. Tout habitant y est infecté, de sa naissance à sa mort, plusieurs fois par an, (jusqu'à 1 000 fois au Congo) et ne peut survivre que grâce à la prémunition qu'il acquiert pendant les 5 15 premières années de sa vie. C'est pendant cette période, et surtout entre 6 mois et 2 ans que le paludisme entraîne une mortalité dont l'estimation est difficile.

Aujourd'hui, près de deux milliards d'êtres humains, souvent parmi 20 les plus déshérités, vivent dans les zones d'endémies et sont exposés au risque paludéen; ils en subissent, souvent sans recours, les effets morbides ou même létaux. La protection de ces groupes à risques, plus du tiers de la population de la planète, constitue un défi pour la santé publique. Plusieurs centaines de millions de cas sont répertoriés chaque 25 année. Plasmodium Falciparum est le parasite responsable de la plupart des cas de paludisme (80 % de cas dans le monde) et des formes les plus graves, souvent mortelles, de la maladie. Les pays développés ne sont pas épargnés : le nombre de cas importés augmente en raison de la progression des transports internationaux.

La résistance de Plasmodium Falciparum aux médicaments 30 constitue maintenant la menace la plus grave pour la lutte contre la maladie. Elle est apparue au début des années 60 en Thaïlande et en Colombie, puis s'est étendue et a atteint l'Afrique en 1978. Les

déplacements de populations ont également joué un rôle dans l'apparition et l'extension de la résistant Plasmodium Falciparum chloroquino-résistant est aujourd'hui largement répandu dans le monde. La résistance à l'association de deuxième recours, Sulfamide/Pyrimethamine, est déjà 5 répandue dans les secteurs chloroquino-réfractaires d'Asie du sud-est et d'Amérique du sud. L'émergence actuelle de polychimio-résistances à la totalité des antimalariques disponibles est redoutable.

Parmi les différentes méthodes de lutte contre le paludisme actuellement disponibles, on peut citer la lutte antilarvaire, et la réduction 10 des sources qui restent à être analysées en terme de réduction de l'incidence des cas. Ces méthodes ne paraissent pas avoir un effet décisif sur le paludisme. Les traitements - intradomiciliaires par insecticides présentent de nombreuses insuffisances (résistance, réticences des populations aux traitements ou prix de revient augmentés, pas de résultats 15 dans les savanes) tandis que les moustiquaires imprégnées par un pyréthrinoïde, réellement efficaces, présentent quelques limitations à l'usage.

Le vaccin polyvalent, pleinement actif contre les différentes formes du parasite et tous les types de paludisme, est sans cesse différé et 20 apparaît comme lointain (Walsh J. , Science 1987 , 235, 1319, Butcher, Parasitologie, 1989, 98, 315). La chimiothérapie demeurera, pour longtemps encore, une méthode de lutte nécessaire pour les populations des zones endémiques.

Un effort de recherche important entrepris à partir de 1963 à 25 l'Institut américain Walter Reed (Washington D.C.), qui a testé plus de 250.000 molécules, a permis la mise sur le marché de Mefloquine (Lariam®) en 1985. Cependant, la résistance à ce nouvel antipaludéen a été induite expérimentalement. Des cas de résistance sur le terrain ont été rapportés et, faits plus graves, des résistances croisées entre mefloquine 30 et autres amino-alcools comme la quinine ou de nouvelles drogues en expérimentation, tel qu'Halofantrine mise sur le marché en 1989 (Halfan®)

ont été mises en évidence (K. Rieckmann, Ann. Rev. Med , 1983, 34, 321-335 ; D. Warhurst, Drugs, 1987 33, 50-65 ; Struchler, Parasitol. Today, 1989, 5, 39-40.).

Dans la classe des hématozoaires comparables à Plasmodium, on 5 note Babésia, infestant particulièrement les animaux. Babésia est très ressemblant à Plasmodium mais infecte surtout les animaux comme les bovins ou le chien. Les parasites responsables de cette maladie sont principalement Babésia Bovis, Babésia cani, Babésia gibsoni, Babésia divergens, Babésia bigemina, Babésia equi est plus spécifiquement 10 impliquée chez le cheval.

Les inventeurs ont mis en évidence une nouvelle classe de molécules possédant une activité antiprotozoaire élevée, en particulier antipaludéenne et antibabésiose. De plus cette activité antipaludéenne s'exerce par un mécanisme tout à fait original et pourrait ainsi éviter une 15 pharmacorésistance toujours redoutée dans cette classe thérapeutique. La conception de ces molécules a été guidée par la mise en évidence d'un métabolisme phospholipidique abondant et spécifique dans le globule rouge impaludé. En effet, la prolifération asexuée intraérythrocytaire du parasite (phase associée aux symptômes cliniques de la maladie) 20 s'accompagne d'une néosynthèse considérable de phospholipides (PL nécessaires à la biogenèse des membranes de Plasmodium). L'augmentation du taux de phospholipides intraérythrocytaire après impaludation atteint 500 % lorsque le parasite est au stade mature.

En conséquence, le métabolisme biosynthétique des phospholipides 25 est pléthorique dans l'érythrocyte, après infection par Plasmodium. Il est complètement absent de l'érythrocyte hôte mature de mammifère qui est totalement dépourvu de la capacité de biosynthèse de PL.

Les différentes voies de biosynthèse des phosphatidylethanolamines (PE) et phosphatidylcholine (PC) sont 30 schématisés dans la figure 1. La présente invention utilise l'observation du blocage du développement du parasite par des substances interférant sur

ce métabolisme à des doses très inférieures à celles interférant avec les cellules saines. Certains ammoniums quaternaires commerciaux et connus pour d'autres activités thérapeutiques ou non, inhibent le développement de Plasmodium Falciparum mais ceci à des doses les rendant inutilisables comme médicament en raison de leurs effets annexes notamment sur le système cholinergique. Ces sels quaternaires sont des trimethylalkylammoniums connus depuis longtemps comme tensioactifs, ou comme dépressants sur le muscle lisse (voir Decamethonium, Procuran®) et ceci par voie parentérale. ISOMAA (Acta Pharmacol; Toxicol 45 (5) 10 1979 et Biochem. Pharmacol 28 (7) 975/980) étudie l'action des alkyltrimethylammoniums quaternaires sur la membrane érythrocytaire du rat, et note un effet protecteur de la membrane à faible concentration et un effet hémolytique à dose plus élevée. Ces trimethylammoniums quaternaires à longue chaîne semblent induire une altération des surfaces cellulaires à concentration relativement élevée (ISOMAA Acta Pharmacol. Toxicol. 44 (1) 1979 36/42). Le mécanisme d'action en modifiant la bicoche lipidique de la membrane plasmique agirait plutôt selon un mécanisme tensioactif effectif à concentration relativement élevée.

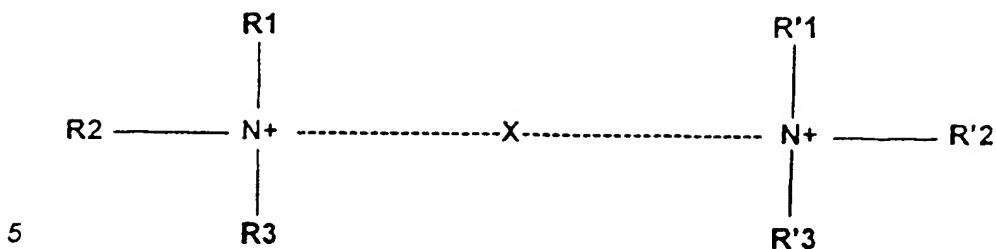
Des séries bis trimethylalkylammoniums à chaîne linéaire longue ont été étudiées notamment pour leurs activités dépolarisantes sur divers modèles cellulaires (Kratskin L Gen. Pharmacol. 1980 11 (1) 119-26 et Skylarov Dokl. Akad. Nauk SSSR 1988 303 (3) 760-3). Les seules activités thérapeutiques notées sont de type cholinomimétique ou cholinolytique par Danilov A F Acta Physiol. Acta Sci. Hung. 1974 45 (3-4) 271-80). On note pour tous ces tensioactifs des groupes trimethylammoniums portés par chaque extrémité d'une chaîne hydrocarbonée généralement d'une longueur de douze enchaînements méthylène. L'atome d'azote supporte donc des substituants identiques peu encombrants sur une chaîne ne dépassant pas 12 atomes de carbone.

Les inventeurs ont trouvé de façon surprenante qu'en diminuant la

symétrie autour de l'atome d'azote de composés bisamonium quaternaires et plus généralement en augmentant leurs encombrements stériques, on augmentait fortement l'inhibition du transporteur de choline chez le parasite. Cette dissymétrie autour de l'atome d'azote est notamment sensible pour les substituants les plus petits. Cette découverte 5 surprenante conjuguée à l'ajustement de la longueur de la chaîne hydrocarbonée supportant ces deux têtes polaires des composés bisamoniums permet de multiplier l'activité sur Plasmodium par un facteur de 1000 voire 100.000 de dérivés connus à chaîne courte. La longueur 10 optimum de la chaîne aliphatique espaçant les deux motifs ammoniums quaternaires influe sur cette activité antiplasmodium. L'altération de la transformation de la choline en phosphatidylcholine est spécifique du parasite hématzoaire notamment Plasmodium Falciparum aux concentrations actives utilisées. Il n'y a pas altération des autres systèmes 15 biosynthétiques.

L'invention concerne donc des nouvelles molécules chimiques contenant deux groupes ammoniums quaternaires portés aux extrémités d'une chaîne hydrocarbonée, et exerçant une forte activité antipaludéenne et antibabésiose. Par activité antipaludéenne et antibabésiose, il faut 20 entendre la capacité d'empêcher le développement du parasite à l'intérieur de l'érythrocyte et ou l'invasion érythrocytaire, et d'entraîner la mort des parasites initialement présents. Il est tout à fait remarquable que des composés de l'invention testés à la fois sur des souches chloroquine sensibles et sur des souches polypharmaco-résistantes présentent la 25 même activité antipaludéenne.

Ainsi, l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un excipient physiologiquement acceptable et, comme principe actif, un composé défini par la formule générale (I) suivante :



(I)

dans laquelle:

10

- R1 représente un groupe hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent indépendamment un groupe hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone éventuellement substitué soit par un groupe méthyle ou éthyle, soit par des groupes halogènes comme le chlore, le brome ou l'iode, soit par des groupes trifluorométhyl, trifluoroéthyl ou trifluoropropyl,

20 où R1 diffère du groupe éthyle, R2 et R3 n'étant pas simultanément méthyle,

ou

- R1 représente un groupement hydroxyalkyle comprenant de 1 à 5 atomes de carbone, les groupes hydroxyles pouvant être éventuellement éthérifiés
- 25 par substitution de l'atome d'hydrogène par un groupe methyl, ethyl, ou substitués par des dérivés silylés du type -Si-(CH₃)₃, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents entre eux et représentent un groupe hydrocarboné saturé éventuellement substitué par des groupes halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des groupes
- 30 trifluoromethyl, trifluoroethyl, trifluoropropyl,

ou

- R1 représente un groupement hydrocarboné mono- ou polyinsaturé ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

5 - R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent une chaîne alkyle linéaire ou ramifiée comportant de 1 à 20 enchaînements hydrocarbonés de, éventuellement substitués par un groupe methyl, ethyl ou par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des motifs trifluoromethyl, trifluoethyl, trifluoropropyl,

ou

10 - R1 représente un groupement hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone, et

- R2 et R3 forment ensemble avec l'azote un hétérocycle azoté saturé comprenant 4 ou 5 atomes de carbone dans lequel un atome de carbone peut être remplacé par un atome de silicium, un atome d'oxygène ou un

15 atome de soufre, ce cycle pouvant comporter en outre un substituant alkyle ayant de 1 à 3 atomes de carbone pouvant être lui-même hydroxyle, halogéné, ou silylé,

où R1', R2' et R3' ont la même définition que R1, R2 et R3 dans la formule (I), sans la restriction concernant les méthyles et les éthyles, les deux têtes

20 polaires pouvant être identiques ou non ;

et où X représente une chaîne hydrocarbonée comportant éventuellement un substituant alkyle ayant 1 à 3 atomes de carbone, cet enchaînement hydrocarboné ayant de 12 à 26 atomes de carbone.

25 Préférentiellement, les deux têtes polaires des composés ci-dessus décrits sont identiques.

Plus particulièrement, les compositions pharmaceutiques selon l'invention comprennent un principe actif défini par la formule générale (I), dans laquelle, les substituants sont choisis selon les combinaisons

30 suivantes :

- R1 représente un groupe alkyle choisi parmi les suivants:

methyl, methylethyl, propyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridécy, tetradécy, pentadécy, hexadécy, heptadécy, octadécy, nonadécy, eicosyl, et

- R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent indépendamment

5 un groupe alkyle choisi parmi les suivants : ethyl, propyl, isopropyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridécy, tetradécy, pentadécy, hexadécy, heptadécy, octadécy, nonadécy, eicosyl éventuellement substitué soit par un groupe méthyle ou éthyle, soit par des groupes halogènes comme le chlore, le brome ou
10 l'iode, soit par des groupes trifluorométhyl, trifluoroéthyl ou trifluoropropyl,

ou

- R1 est un groupement hydroxyalkyle comprenant de 1 à 5 atomes de carbone, notamment les groupes hydroxymethyl, hydroxyethyl, hydroxypropyl, hydroxybutyl, hydroxypentyl, ces groupes hydroxyles pouvant être éventuellement éthérifiés par substitution de l'atome d'hydrogène par un groupe methyl, ethyl, ou -Si-(CH₃)₃, et
15 - R2 et R3 sont identiques ou différents l'un de l'autre et peuvent représenter un groupement hydrocarboné saturé propyl, isopropyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, éventuellement substitué par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des groupes trifluorométhyl, trifluoroéthyl, trifluoropropyl,
20

ou

25 - R1 représente une chaîne hydrocarbonée mono ou polyinsaturée du type propényl, propynyl, butényl, butynyl, butadiényl, pentényl, pentadiényl, pentynyl, hexényl, hexadiényl, hexynyl, isoprényl, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent une chaîne alkyl linéaire ou ramifiée comportant de 1 à 20 enchaînements hydrocarbonés
30 tel que methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridécy, tetradécy,

pentadécy1, hexadécy1, heptadécy1, octadécy1, nonadécy1, eicosyl, éventuellement substitués par un groupe methyl ou ethyl pouvant être lui-même substitué par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des groupes trifluoromethyl, trifluoethyl, trifluoropropyl,

5

ou

- R1 représente un groupe methyl, methylethyl, propyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridécy1, tetradécy1, pentadécy1, hexadécy1, heptadécy1, octadécy1, 10 nonadécy1, eicosyl, et
- R2 et R3 forment ensemble avec l'azote un hétérocycle azoté saturé comprenant 4 ou 5 atomes de carbone dans lequel un atome de carbone peut être remplacé par un atome de silicium, un atome d'oxygène ou un atome de soufre, ce cycle pouvant comporter en outre un substituant du 15 type methyl, ethyl, hydroxymethyl, hydroxyethyl, methyl ethyl, hydroxypropyl, un groupe trifluoromethyl, un groupe trifluoroethyl, ou un groupe trimethylsilyl, trimethylsilyloxy .

De manière préférée, X est ici une chaîne hydrocarbonée saturée de préférence linéaire, ayant entre 14 et 26, de préférence entre 14 et 22, 20 par exemple 16 atomes de carbone.

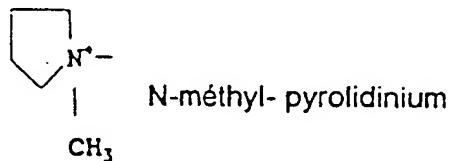
Avantageusement, le principe actif est choisi parmi les composés suivants :

- N,N'-dimethyl-N,N'-diethyl-N,N'-dipropyl-1,16-hexadecanediaminium, 25 dibromure,
- N,N'-dimethyl-N,N'-diethyl-N,N'-dipropyl-1,20-eicosanediaminium, dibromure,
- N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,16-hexadecanediaminium dibromure,
- N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,18-octadecanediaminium dibromure, 30
- N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,21-heneicosanediaminium dibromure -1,1'-(1,14-tetradecanediyl) bis (1-methylpyrrolidinium) dibromure,

-1, 1'-(1, 16-hexadecanediyl) bis (1 -methylpyrrolidinium) dibromure,
 1,1'-(1,16-hexadecanediyl) bis (2-hydroxymethyl-1-methylpyrrolidinium
 dibromure,
 N,N'-di-(2-hydroxyethyl) -N,N,N',N'-tetrapropyl-1,20-eicosanediaminium
 5 dibromure.

Dans le cas de l'hétérocycle azoté, R1 peut être un méthyle, pour fournir le type de tête polaire suivant :

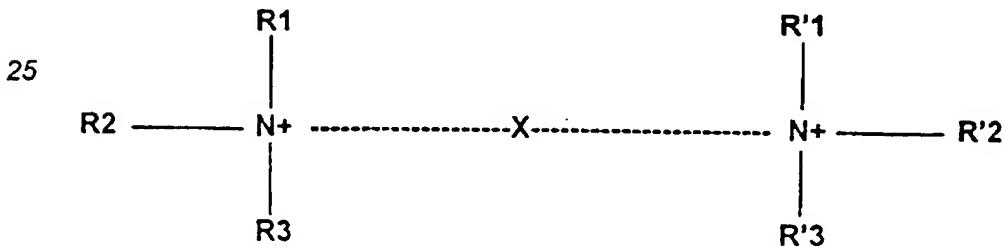
10



Un composé constituant un exemple préféré de principe actif selon
 15 l'invention, et comportant deux de ces têtes polaires, est le - 1,1'- 1,16-
 hexadecanediyl bis (1-methylpyrrolidinium) dibromure.

L'invention concerne en outre un composé pour utilisation comme agent thérapeutique, de préférence en tant qu'agent anti-paludéen et/ou antibabésiose.

20 L'invention vise également l'utilisation d'un composé défini par la formule générale (I), pour l'obtention d'un médicament antipaludéen, ou antibabésiose :



30

(I)

dans laquelle:

- R1 représente un groupe hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone, et
- 5 - R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent indépendamment un groupe hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone éventuellement substitué soit par un groupe méthyle ou éthyle, soit par des groupes halogènes comme le chlore, le brome ou l'iode, soit par des groupes trifluorométhyl, trifluoroéthyl ou trifluoropropyl ;

10

ou

- R1 représente un groupement hydroxyalkyle comprenant de 1 à 5 atomes de carbone, les groupes hydroxyles pouvant être éventuellement éthérifiés par substitution de l'atome d'hydrogène par un groupe methyl, ethyl, ou 15 substitués par des dérivés silylés du type -Si-(CH₃)₃, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents entre eux et représentent un groupe hydrocarboné saturé éventuellement substitué par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des groupes trifluoromethyl, trifluoroethyl, trifluoropropyl ;

20

ou

- R1 représente un groupement hydrocarboné mono ou polyinsaturé ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent une chaîne alkyl 25 linéaire ou ramifiée comportant de 1 à 20 enchaînements hydrocarbonés, éventuellement substitués par un motif methyl, un ethyl ou par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des motifs trifluoromethyl, trifluoroethyl, trifluoropropyl ;

30 ou

- R1 représente un groupement hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone, et
- R2 et R3 forment ensemble avec l'azote un hétérocycle azoté saturé comprenant 4 ou 5 atomes de carbone dans lequel un atome de carbone 5 peut être remplacé par un atome de silicium, un atome d'oxygène ou un atome de soufre, ce cycle pouvant comporter en outre un substituant alkyle ayant de 1 à 3 atomes de carbone pouvant être lui-même hydroxylé, halogéné, ou silylé;

10 où R1', R2' et R3' ont la même définition que R1, R2 et R3 dans la formule (I),

et où X représente une chaîne hydrocarbonée saturée contenant des groupements -CH₂- ou des groupements cycliques comportant 15 éventuellement un substituant alkyle ayant 1 à 3 atomes de carbone, cet enchaînement hydrocarboné ayant entre 11 et 26 atomes de carbone.

Selon cet aspect de l'invention, l'utilisation des composés correspondant aux principes actifs précédemment définis est plus 20 particulièrement préférée.

L'invention concerne aussi un procédé pour la préparation d'une composition pharmaceutique caractérisé en ce qu'un principe actif tel que ci-dessus défini par la formule générale (I) est combiné avec un excipient physiologiquement acceptable.

25 En outre ce principe actif peut être combiné avec un additif conventionnel, tel qu'un agent conservateur, un agent antioxydant ou un diluant.

30 L'invention vise également les principes actifs de l'invention, tels que définis par la formule générale (I) relative aux compositions pharmaceutiques.

La présente invention concerne également un procédé de préparation des composés décrits. Les composés selon (I) peuvent être préparés selon les techniques connues. Parmi celles-ci, on peut citer l'action d'une amine tertiaire sur un alkane α - ω dihalogéné soit un dichloro, un dibromo, ou un diiodo alkane. La réaction peut avoir lieu sans solvant de préférence sous azote, dans la mesure où l'un des réactifs au moins peut servir de milieu solvant. On peut aussi bien effectuer la réaction dans un solvant choisi parmi les alcools, les cétones, le Dimethylformamide, l'acétonitrile, les éthers, les éthers de polyglycol, ou le mélange de plusieurs solvants choisis parmi les précédents ou leur mélange avec des hydrocarbures aromatiques comme le toluène ou le benzène. On isole de cette façon l'halogénure d'ammonium quaternaire, par exemple le dibromure si l'on a utilisé un dibromoalkane.

La proportion des réactifs mis en présence est celle de la stoechiométrie, mais elle peut faire apparaître un excès de dérivé halogéné, notamment dans le cas où celui-ci peut être utilisé comme solvant réactionnel.

On peut cependant obtenir un sel d'un autre acide minéral ou organique par un procédé habituel, par échange sur une résine échangeuse d'ions. La réaction peut être effectuée à température ambiante, cependant on élèvera la température avantageusement pour accélérer son accomplissement. Cette température sera comprise entre l'ambiance et la température d'ébullition du milieu solvant utilisé.

Dans le cas où l'on veut obtenir un dérivé non symétrique, on fait réagir un équivalent d'amine tertiaire avec un ω -alkanol primaire, puis par halogénéation de la fonction alcool par l'acide halogénohydrique, par exemple l'acide bromhydrique concentré, on obtient un alkyl ammonium quaternaire ω -halogéné, qui sera ensuite mis en réaction avec la seconde amine quaternaire choisie.

Le produit final peut être isolé directement par cristallisation à partir du milieu réactionnel, il pourra être également séparé du solvant par

évaporation et recristallisé dans un autre solvant choisi parmi les alcools, les cétones, les esters, les éthers, les ether-alcools, l'acide acétique . Ces compositions peuvent être administrées par voie orale, par voie parentérale, rectale, percutanée ou permucosale, ceci sous la forme de 5 comprimés, de dragées, capsules, solutions, sirops, émulsions, suspensions, ou de formes galéniques capables de moduler la libération du principe actif. De telles compositions peuvent être administrées à l'homme ou à l'animal à des doses comprises entre 0,01 mg/kg et 50 mg/kg.

10 Lors d'une application antibabésiose, les compositions pharmaceutiques sont formulées de manière appropriée pour une application vétérinaire.

Outre les dispositions qui précédent, l'invention concerne encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre , qui 15 se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention. Il est entendu toutefois que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation. Tous les dérivés ont été soumis à l'analyse élémentaire, avec une tolérance maximale de 0,3 % dans les résultats 20 obtenus, par rapport aux valeurs calculées. Les points de fusion ont été réalisés en tube capillaire et ne sont pas corrigés, les points d'ébullition n'ont pas été corrigés, la pression étant mesurée par une jauge de Pirani. Les spectres Infrarouge ont été réalisées sur un appareil Philipps PU 9714 en lames de NaCl pour les liquides et en pastilles de KBr pour les solides. 25 Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un appareil Brucker WP 200 en solution dans le Deutérochloroforme ou le DMSOd6 par rapport au TMS de référence. Sauf mention contraire, les produits ont été isolés à l'état de Bromhydrates.

EXEMPLESII/ SYNTHESE DE CERTAINES MOLECULES ACTIVES

5 EXEMPLE 1: -N, N'-dimethyl-N, N'-diethyl-N, N'-dipropyl-1, 14
tetradecanediuminium, dibromure.

On ajoute à 200 ml d'éthanol, 35,6 g (0.1 Mole) de -1,14 dibromotetradecane et 11,1 g de N-ethyl-N-methyl-1-propanamine . On porte à reflux pendant 8 heures jusqu'à accomplissement de la réaction, 10 suivi par Chromatographie en Couche Mince sur plaque de silice dans un système solvant comme Propanol/Pyridine/acide acétique/Eau . La solution est ensuite évaporée et le résidu est recristallisé dans un mélange Isopropanol/acétate d'éthyle. On obtient le dérivé du titre sous la forme de cristaux de pF = 185/190 °C .

15

Les dérivés α - ω dibromés non commerciaux peuvent être synthétisés entre autres par une synthèse malonique à partir du dérivé dibromoalkane inférieur de quatre atomes de carbone. A titre d'exemple, on décrit ci-après la synthèse (a/, b/, c/ et d/) du -1,14-dibromotetradécane, 20 à partir du dibromodécane :

a/ Synthèse de l'Ethyl ester de l'acide -2,13-diethoxycarbonyl-1, 14-tétradécanedioïque :

On dissout un atome/gramme de Sodium (23 g) dans 500 ml d'éthanol anhydre, puis on introduit 1,1 mole de Diethyl malonate. A la 25 suspension résultante, on ajoute lentement 0.5 Mole de -1,10 dibromodécane entre 30 et 50 °C . On maintient le reflux quelques heures puis, après distillation et lavages à l'eau, on distille le produit brut . On obtient le dérivé du titre à l'état pur sous forme d'une huile distillant à 160 /170 °C sous 10^3 mBar avec un rendement de 80 %.

30

b/ Synthèse de l'acide -1,1 4-tetradecanedicarboxylique :

La totalité du produit obtenu a/ ci-dessus est saponifié dans un mélange de 170 g de Potasse et 200 ml d'eau. L'alcool produit est distillé puis le milieu est fortement acidifié par de l'acide sulfurique concentré. On 5 porte à l'ébullition jusqu'à la fin de décarboxylation . Quand tout le CO₂ est dégagé, on refroidit et extrait par un solvant non miscible qu'on lave jusqu'à neutralité. Après évaporation et recristallisation, on obtient le dérivé du titre de pF = 160 °C

c/ Synthèse du -1,14-Tetradecanediol :

10 Le produit de l'essai précédent b/ est estérifié en présence d'un excès d'éthanol et de quelques millilitres d'acide sulfurique porté à l'ébullition. L'avancement de la réaction peut être suivi en C.C.M. dans le système solvant suivant : Acide Formique / Formiate d'éthyle / Toluène. Après évaporation de l'excès d'alcool et lavage à l'eau en présence d'un 15 solvant non miscible, on obtient l'ester éthylique de l'acide -1,14-tetradecanedioïque sous forme d'une huile épaisse de Péb = 165 °C sous 1 mbar . La totalité du produit est réduite par LiAlH₄ en solution dans le THF, l'avancement de la réduction est suivi par CCM . Après traitement par l'acide dilué, le produit est extrait par un solvant puis chromatographie sur 20 colonne de Silice par le mélange hexane/acétate d'éthyle. Le rendement total à partir du diacide est supérieur à 65 % .

d/ Synthèse du -1,14-dibromotetradecane :

On introduit 23 g (0.1 mole) de dialcool dans 200 ml d'acide bromhydrique à 48 % et porte à reflux 24 heures. Après refroidissement, 25 on sépare la couche organique, on la redissout dans le chloroforme et on lave à l'eau. Par chromatographie sur colonne de Silice avec de l'hexane, on obtient le dérivé du titre avec un rendement de 45 % par rapport à l'alcool ; le point de fusion du produit est de 43 °C.

En pratiquant comme précédemment décrit dans l'exemple 1, et 30 avec les dibromoalkanes correspondants à la place du -1,14-dibromotetradecane, on obtient les dérivés suivants :

EXEMPLE 2 : N,N'-dimethyl-N, N'-diethyl-N, N'-dipropyl-1, 15-pentadecanediaminium, dibromure de pF = 230 °C.

5 EXEMPLE 3 : N,N'-dimethyl-N,N'-diethyl-N,N'-dipropyl-1,16-exadecanediaminium, dibromure de pF = 232 °C .

EXEMPLE 4 : N,N'-dimethyl-N, N'-diethyl-N, N'-dipropyl-1, 17-heptadecanediaminium, dibromure de pF = 205 °C .

10

EXEMPLE 5 : N,N'-dimethyl-N,N'-diethyl-N,N'-dipropyl-1,18-octadecanediaminium, dibromure de pF = 175 °C .

15

EXEMPLE 6 : N, N'-dimethyl-N, N'-diethyl-N, N'-dipropyl-1,20-eicosanediaminium, dibromure de pF = 130 °C.

EXEMPLE 7 : N,N'-dimethyl-N, N'-diethyl-N, N'-dipropyl-1,22-Cosanediaminium, dibromure de pF = 130 °C .

20 EXEMPLE 8 : -N, N, N, N', N', N' hexapropyl-1, 14-tetradecanediaminium, dibromure .

On ajoute 3,56 g (10 mM) de -1,14-dibromotetradecane dans 20 ml de tripropylamine et porte à 80/90 °C pendant une nuit. On évapore sous vide l'excès d'amine tertiaire, on reprend par le minimum d'éthanol et on 25 reprécipite à l'éther. Après recristallisation dans le mélange Isopropanol/ éther isopropylique; on obtient le dérivé du titre de pF =170 °C .

EXEMPLE 9 : -N, N, N, N', N', N' hexapropyl-1, 16-hexadecanediaminium, dibromure.

On opère comme ci-dessus avec le -1,16-dibromohexadecane en recristallisant dans Méthanol/ éther, on obtient le dérivé du titre sous forme hygroscopique de pF= 185 °C .

5 EXAMPLE 10 : -N, N, N, N', N', N' hexapropyl-1,20-
eicosanediaminium, dibromure.

La synthèse malonique décrite à l'exemple 1 est appliquée au -1,16-dibromohexadecane pour aboutir au -1,20-eicosandiol obtenu à l'état pur après chromatographie sur colonne avec un pF = 93 °C . La bromation 10 selon l'exemple 1 - d - variante 2 aboutit au -1,20-dibromoeicosane de pF = 62 °C . La réaction avec la tripropylamine selon l'exemple 1 aboutit au dérivé du titre sous forme cristallisée ayant un pF = 205 °C .

EXAMPLE 11 : -N, N, N, N', N', N' hexapropyl-1,24-
15 tetracosanediaminium, dibromure.

La synthèse malonique est appliquée cette fois au dérivé bromé décrit ci-dessus et aboutit au -1,24-dibromotetracosane, qui traité par tripropylamine selon l'exemple 1 donne le dérivé du titre de pF = 105 °C .

20 EXAMPLE 12 : - N, N, N, N', N', N' hexapropyl-1,16-
hexadecanediaminium, dibromure.

A partir du dérivé -1,16-dibromohexadécane et la tripropylamine dans les conditions ci-dessus, on obtient le dérivé du titre sous forme cristallisée de pF = 227 °C .

25

EXAMPLE 13 : N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,16-
hexadecanediaminium, dibromure.

En substituant la N-methyldiethylamine à la tripropylamine, on 30 obtient le dérivé du titre de pF = 170 °C .

EXEMPLE 14 : N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,18 octadecanediaminium, dibromure.

On opère comme ci-dessus avec du dérivé -1,18dibromooctadecane
5 et l'on obtient le produit cité de pF = 206 °C.

EXEMPLE 15 : N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,21- heneicosanediaminium, dibromure.

A partir du diol correspondant obtenu selon Lukes (Col. Czech. 10 Chem. Comm. 26 , -1961- 1719/1722) et action du tribromure de phosphore selon l'exemple 1, on obtient le dérivé α - ω dibromé que l'on fait réagir comme ci-dessus sur la N-methyldiethylamine pour aboutir au dérivé du titre de pF = 205 °C .

15

EXEMPLE 16 : -1,1'-(1,14-tetradecanediyl) bis (1-methylpyrrolidinium) dibromure.

On ajoute 21.36 g (0.06 mole) de -1,14-dibromododecane et 11.07 g (0.13 mole) de N-methylpyrrolidine à 200 millilitres d'éthanol , porte à 20 reflux 6 heures jusqu'à fin de réaction. Après évaporation à sec et recristallisation dans un mélange éthanol/éther , on obtient le dérivé du titre de pF = 192 °C .

EXEMPLE 17 : -1,1-(1,16-hexadecanediyl) bis (1-methylpyrrolidinium) dibromure.

Dans les conditions de l'exemple ci-dessus et avec le -1,16 dibromodécane, on obtient avec la N-methylpyrrolidine, le dérivé du titre sous forme cristalline de PF = 178 °C .

30 EXEMPLE 18 : 1,1'-(1,16-hexadecanediyl) bis (2-hydroxymethyl-1-methylpyrrolidinium) dibromure .

Si dans l'exemple précédent, on substitue la N-methylpyrrolidine par de la 2-hydroxymethyl-1-methyl-pyrrolidine, on obtient le dérivé du titre de pF = 95 °C.

5 EXEMPLE 19 : 1,1'-(1,22 -docosanediyl) bis (2-hydroxymethyl-1-methylpyrrolidinium) dibromure.

A partir du 1,22-dibromodocosane, préparé à partir du dialcool correspondant, lui-même synthétisé par action de l'acide bromhydrique sur le docosa-1,21 -diène, on obtient le dérivé du titre de pF = 102 °C.

10

EXEMPLE 20 : -1,1'-(1,16-hexadecanediyl) bis (1-methyl-3hydroxy methyl piperidinium) dibromure.

Dans les conditions de l'exemple 16 avec du -1,16-dibromohexadecane et du 1-methyl-3-piperidinemethanol, on obtient le 15 dérivé cité de pF = 107 °C.

EXEMPLE 21 : 1,1'-(1,16-hexadecanediyl) bis (1-methylmorpholinium) dibromure.

En utilisant le même dérivé bromé et la N-methylmorpholine, on 20 obtient le dérivé du titre de p = 85 °C.

EXEMPLE 22 : N,N'-didodecyl-N,N,N',N'-tetramethyl- 1,16 hexadecanediaminium dibromure.

L'utilisation de la N-Dimethylaurylamine avec le dérivé dibromé ci-dessus 25 aboutit au dérivé du titre sous forme d'un produit blanc de pF = 128 °C.

EXEMPLE 23 : N, N'-didodecyl-N, N, N', N'-tetramethyl- 1,16 octadecanediaminium dibromure.

Comme ci-dessus avec le dérivé dibromo en C18, on obtient le 30 dérivé recherché de PF = 103 °C.

EXEMPLE 24 : -N,N'-di (2-propynyl)-N,N,N',N'-tetramethyl-1,14-tetradecane diaminium dibromure.

On utilise la N-dimethylpropargylamine dans les conditions précédentes et l'on obtient le dérivé du titre de pF=145°C le spectre de 5 RMN enregistré dans le DMSOd6 présente les déplacements caractéristiques suivants : 3,4 ppm (m), 4H, -N-CH₂-CH₂- 4,1 ppm; 4,1 ppm (t), 2H, CH≡C-; 4,5 ppm (d) 4H, C-CH₂-N-.

EXEMPLE 25 : -N,N'-di (2-propenyl)-N,N,N',N'-tetramethyl-1,14-tetradecane diaminium dibromure.

10 Comme ci-dessus avec la N-dimethylallylamine, on obtient le produit ci-dessus de pF = 50 / 60 °C. Les déplacements chimiques caractéristiques en RMN sont - 4,0 ppm (d), 4H, CH-CH₂-N- 5,6 ppm (m) 4H, CH₂=CH-; 6,0 ppm (m) 2H, CH₂=CH-CH₂.

15

EXEMPLE 26: -N,N'-di (3-butynyl)-N, N, N', N'-tetramethyl 1,14-tetradecanediaminium dibromure.

20 De la même façon que ci-dessus avec l'maineacétylénique correspondante, on obtient le dérivé du titre de pF = 170 °C . Son spectre RMN présente les déplacements chimiques suivants : 2,75 ppm, (td), 4H, CH≡C-CH₂-CH₂-N , 3,1 ppm (t) 2H, CH≡C-CH₂ ; 3,25 ppm (m) 4H, CH≡C-CH₂-CH₂-N-.

EXEMPLE 27: -N, N'-di-(2-hydroxyethyl) -N, N, N', N'-tetrapropyl-1, 25 14 tetradecane diaminium dibromure.

A partir de N-dipropylethanolamine et du dérivé bromé en C14, on obtient le dérivé du titre de pF = 188 / 190 °C.

EXEMPLE 28 : -N, N'-di-(2-ethoxyethyl)-N, N, N', N'-tetrapropyl-1, 30 14 tetradecanediaminium dibromure .

En opérant comme ci-dessus à partir de N-dipropyl-2-ethoxyethylamine, on obtient le dérivé du titre, de pF = 145 / 150 °C.

EXEMPLE 29 : -N, N'-di-(2-hydroxyethyl) -N, N, N', N'-tetrapropyl-1, 1

5 6 hexadecane diaminium dibromure.

On opère selon l'exemple 27 avec du -1,16-dibromohexadecane au lieu de -1,14-tetradécane et on obtient le dérivé recherché de pF = 120 °C.

EXEMPLE 30 : N, N'-di-(2-hydroxyethyl) -N, N, N', N'-tetrapropyl-1,20-

10 eicosanediaminium dibromure.

Par action du dérivé dibromé en C20 selon l'exemple précédent on obtient le dérivé cité de pF = 85 / 90 °C.

III/ ACTIVITE ANTIPALUDEENNE

15

L'activité antipaludéenne des dérivés selon les exemples précédents est testée sur l'humain infesté par Plasmodium falciparum. Le produit à tester est mis en contact avec les érythrocytes humains infectés pendant 24 heures. Un précurseur radioactif d'acides nucléiques 20 l'Hypoxanthine (³H) est ensuite ajouté. Le précurseur ne s'incorpore que dans les cellules infectées par un parasite en croissance, c'est à dire dans les cellules que la drogue n'aura pas affectées.

L'aptitude ou non à incorporer le précurseur reflète donc la viabilité des cellules impaludées. La durée des tests est de 60 à 70 heures (test 25 de DESJARDINS R.E. , CANFIELD C.J., HATNES J.D. et CHULAY J.D., Antimicrob. Agents Chemother. 1979, 16 , p 710-718). Les résultats sont consignés dans le tableau I ci-après, sous forme de IC50 (ou DE50), soit la concentration de produit dans le milieu expérimental capable d'inhiber in vitro la croissance du parasite d'une valeur de 50%.

La vérification du mécanisme d'action est réalisée sur les divers dérivés selon l'invention par l'étude de l'interférence spécifique avec la biosynthèse des différentes biomolécules, acides nucléiques, protéines et phospholipides à partir de l'incorporation de précurseurs radiomarqués soit 5 (³H) Hypoxanthine, (³H) Isoleucine, (³H) Choline. La spécificité au sein même du métabolisme phospholipidique est déterminée par comparaison avec l'effet sur l'incorporation de (³H) Ethanolamine dans la phosphatidyléthanolamine (Ancelin M.L. Vialettes F. et Vial H.J. 1991, Anal. Biochem. 199, 203-209).

10

Activité antipaludique de G25 chez le singe infecté par le parasite humain *P. falciparum* :

En dehors des chimpanzés, seules deux espèces de singes d'Amérique du Sud, Aotus et Saimiri Scirius, ont pu être infecté par *P. falciparum*. L'infection des singes Aotus par le parasite humain offre actuellement le meilleur et quasi-unique modèle pour l'évaluation des approches thérapeutiques ou vaccinales du paludisme (Collins W.E, Gallaud C.G. Sullivan J.S., and Morris C.L, « Selections of different strains of *Plasmodium falciparum* for testing blood stages in Aotus Nancymai monkeys ». An. J. Trop. Med. Hyg., 1994, 51 (2) 224-232).

20 L'activité antipaludique a donc été évaluée chez le singe Aotus Lemurinus infecté par l'isolat FVO (*falciparum* Vietnam Oaknoll) de *P. falciparum*. Cet isolat est chloroquine résistant et est invariablement létal pour les singes Aotus de la « Fundacion Centro de Primates » de 25 l'Université del Valle, Cali, Colombie.

Ainsi que le montre la Figure 6, le singe Aotus est infecté par *P. falciparum* (isolat FVO) au jour 0. Lorsque la parasitémie atteint 5,6%, le traitement par G25 (dissous dans NaCl 9%) a été initié à raison de 16 doses de 0,2 mg/kg (2 administrations par jour pendant 8 jours). La 30 décroissance de la parasitémie est apparente dès la deuxième dose. Pour

comparaison, la parasitémie d'un singe traité par le mélange sulfadoxine/pyriméthamine (FANSIDAR) est représentée.

Au total, 15 singes ont été infectés puis traités par G25 donné en intramusculaire à des doses allant de 0,010 à 0,2 mg/kg. Des guérisons

5 complètes (vérifiées par PCR) et sans recrudescence (observation pendant 6 mois et contrôle par la susceptibilité à une nouvelle infection), ont été observés à des doses aussi faibles que 0,030 mg/kg. A 0,01 mg/kg, G25 est actif (clearance de la parasitémie) mais ne conduit pas à une guérison complète (observation de recrudescence).

10 Considérant la dose maximum tolérable chez le singe (voisine de 1,5 mg/kg, il s'ensuit que l'index thérapeutique (DL_{50}/DE_{50}) chez le singe est supérieur à 50.

III / ACTIVITE ANTIPALUDEENNE ET TOXICITE

15

Afin d'évaluer l'index thérapeutique des divers produits, on a mesuré l'activité de ceux-ci dans un test *in vivo* et comparé à la toxicité aiguë chez l'animal. Cette activité est mesurée suivant le test décrit par PETERS W. (Chemotherapy and Drug résistance in Malaria, 1970). Un composé est 20 administré pendant quatre jours consécutifs à des souris préalablement impaludées par Plasmodium vinckeii, petteri, ou chabaudi, ledit composé étant dissous dans une solution de NaCl à 0.9 %. Les préparations sont ainsi administrées par voie intraperitoneale ou par voie sous-cutanée à des souris Swiss mâles infectées par voie IV, avec Plasmodium petterei ou 25 Plasmodium chabaudi (10^6 cellules infectées). Le composé est administré deux fois par jour pendant 4 jours consécutifs, la première injection étant pratiquée 2 heures après l'infestation et la deuxième, 10 heures après. La parasitémie est déterminée par un frottis, le jour suivant la fin du traitement. La toxicité est mesurée *in vivo* selon la même méthode, les 30 animaux ayant reçu dans les conditions d'administration ci-dessus, 2 injections par jour pendant 4 jours (toxicité semi chronique). Les résultats

sont exprimés sous forme de DL 50, soit la dose ayant entraîné la mort de 50% des animaux.

Les résultats des essais sont résumés dans le tableau I ci-après sous forme d'index thérapeutique, soit le rapport de l'activité à la toxicité 5 mésurées dans des conditions identiques comme décrit ci-dessus.

IV/ SPECIFICITE D'ACTION

1- Les molécules selon l'invention ont une action spécifique sur le 10 métabolisme des phospholipides par rapport au métabolisme des acides nucléiques et, au sein du métabolisme phospholipidique. Les tests d'activité in vitro sont pratiqués sur les érythrocytes humains infestés par Plasmodium Falciparum. Les précurseurs radioactifs utilisés tels que la choline, l'éthanolamine ou l'hypoxanthine, sont ajoutés et permettent de 15 mesurer l'effet du produit sur ces divers métabolismes. Tous les composés testés présentent une spécificité d'action sur la biosynthèse de la phosphatidylcholine, avec une étroite corrélation entre l'action sur ce métabolisme et l'action antipaludéenne proprement dite.

2- Les molécules selon l'invention ont montré à l'inverse une 20 absence totale d'action par rapport à d'autres systèmes cellulaires. Ainsi leurs effets sur la viabilité de la lignée lymphoblastoïde SAR ont été mesurés : il n'existe aucune corrélation entre la concentration conduisant à une inhibition de 50 % de la viabilité de la lignée cellulaire LV50 et la IC50 relative à Plasmodium Falciparum. Cette même IC50 a été comparée à 25 l'IC 50 nécessaire à inhiber l'entrée de la choline dans les synaptosomes du système nerveux central selon Tamari (Brain Res. 473, 205-226). L'effet sur le système nerveux ne se manifeste qu'à des doses 100 à 1000 fois supérieures.

V / ACTIVITE ANTIBABESIA IN VITRO

Le procédé de criblage d'activité anti-malaria, basé sur l'incorporation de l'(³H) Hypoxanthine par le parasite, est utilisé pour tester

5 l'activité anti-métabolique de tels composés sur Babesia Bovis, Babesia Canis. Une relation étroite est trouvée entre le taux d'incorporation de (³H) Hypoxanthine dans une mesure standard et le pourcentage de cellules parasitées, déterminé par examen microscopique. Cette activité métabolique est quantifiée et évaluée dans le tableau ci-dessous par la

10 cotation +++ pour les molécules affichant dans le test une inhibition de 50 % de l'incorporation de (³H) Hypoxanthine (ID 50), ces molécules étant à une concentration inférieure ou égale à 0,01 Micromolaire. La cotation est de ++ pour la même activité à une concentration de 0,01 à 0,1 micromolaire et enfin de + pour une concentration inférieure ou égale à 1

15 Micromolaire.

Tableau I :

Composés	IC50 exprimée en micromoles	Index thérapeutique	Activité/ Babesia à 10 millimole
EXAMPLE 1	0,01	50	++
EXAMPLE 2	0,01	42	+
EXAMPLE 3	0,003	15	++
EXAMPLE 4	0,002	17	++
EXAMPLE 5	0,001	12	+++
EXAMPLE 6	0,003	15	++
EXAMPLE 7	0,01	35	++
EXAMPLE 8	0,1	20	+
EXAMPLE 9	0,007	36	+++

EXEMPLE 10	0,7	14	+
EXEMPLE 11	1,6	28	+
EXEMPLE 12	0,001	11	++
EXEMPLE 13	0,0005	6	+++
EXEMPLE 14	0,00004	14	+++
EXEMPLE 15	0,000003	12	+++
EXEMPLE 16	0,0009	8	+++
EXEMPLE 17	0,0006	7	+++
EXEMPLE 18	0,001	22	+++
EXEMPLE 19	0,07	40	+
EXEMPLE 20	0,0003	17	+++
EXEMPLE 21	0,001	25	+++
EXEMPLE 22	1	20	++
EXEMPLE 23	0,1	35	+
EXEMPLE 24	0,007	12	++
EXEMPLE 25	0,005	15	+++
EXEMPLE 26	0,04	45	++
EXEMPLE 27	0,01	15	++
EXEMPLE 28	0,01	40	+++
EXEMPLE 29	0,005	12	++
EXEMPLE 30	0,0003	55	+++

LEGENDE DES FIGURES:

Figure 1 : Schéma des différentes voies de biosynthèse de phosphatidylethanolamine (PE) et de phosphatidylcholine (PC).

5

Figure 2 : Corrélation entre l'activité antipaludéenne (IC50) et l'action sur le métabolisme phospholipidique (PL50) ($r = 0,86$, ce qui correspond à un risque très inférieur à 0,01 %). LV50 représente une inhibition de 50% de la viabilité cellulaire.

10

Figure 3 : Voies de synthèse de bisammoniums quaternaires (dépend de «n»).

Figure 4 : Réactions faisant intervenir des synthèses maloniques.

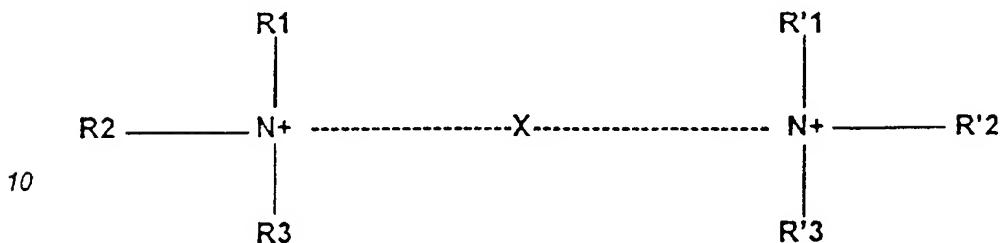
15

Figure 5 : Synthèse de dérivés bisammoniums comprenant des groupements acétyléniques et ethyléniques.

Figure 6 : Effet antipaludique de G25 chez le singe infecté par P.
20 falciparum à parasitémie de 6%.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant un excipient physiologiquement acceptable et, comme principe actif, un composé défini 5 par la formule générale (I) suivante:



(I)

15 dans laquelle:

- R1 représente un groupe hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent indépendamment 20 un groupe hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone éventuellement substitué soit par un groupe méthyle ou éthyle, soit par des groupes halogènes comme le chlore, le brome ou l'iode, soit par des groupes trifluorométhyl, trifluoroéthyl ou trifluoropropyl ;

25 où R1 diffère du groupe éthyl, R2 et R3 n'étant pas simultanément méthyle,

ou

- R1 représente un groupement hydroxyalkyle comprenant de 1 à 5 atomes 30 de carbone, les groupes hydroxyles pouvant être éventuellement éthérifiés

par substitution de l'atome d'hydrogène par un groupe methyl, ethyl, ou substitués par des dérivés silylés du type -Si-(CH₃)₃, et

- R₂ et R₃ sont identiques ou différents entre eux et représentent un groupe hydrocarboné saturé éventuellement substitué par des groupes 5 halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des groupes trifluoromethyl, trifluoroethyl, trifluoropropyl ;

ou

- R₁ représente un groupement hydrocarboné mono ou polyinsaturé ayant 10 de 1 à 6 atomes de carbone, et
 - R₂ et R₃ sont identiques ou différents et représentent une chaîne alkyle linéaire ou ramifiée comportant de 1 à 20 enchaînements hydrocarbonés de, éventuellement substitués par un groupe methyl, ethyl ou par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des motifs trifluoromethyl, 15 trifluoethyl, trifluoropropyl;

ou

- R₁ représente un groupement hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone, et
 - 20 - R₂ et R₃ forment ensemble avec l'azote un hétérocycle azoté saturé comprenant 4 ou 5 atomes de carbone dans lequel un atome de carbone peut être remplacé par un atome de silicium, un atome d'oxygène ou un atome de soufre, ce cycle pouvant comporter en outre un substituant alkyle ayant de 1 à 3 atomes de carbone pouvant être lui-même hydroxyle, 25 halogéné, ou silylé;

où R_{1'}, R_{2'} et R_{3'} ont la même définition que R₁, R₂ et R₃ dans la formule (1), sans la restriction concernant les méthyles et les éthyyles, les deux têtes polaires pouvant être identiques ou non;

et où X représente une chaîne hydrocarbonée comportant éventuellement un substituant alkyle ayant 1 à 3 atomes de carbone, cet enchaînement hydrocarboné ayant de 12 à 26 atomes de carbone.

5 2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 dans laquelle:

- R1 représente un groupe alkyle choisi parmi les suivants : methyl, méthylethyl, propyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridécyl, tetradeçyl, pentadéçyl, 10 hexadéçyl, heptadéçyl, octadéçyl, nonadéçyl, eicosyl, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent indépendamment un groupe alkyle choisi parmi les suivants : ethyl, propyl, isopropyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridéçyl, tetradeçyl, pentadéçyl, hexadéçyl, heptadéçyl, octadéçyl, 15 nonadéçyl, eicosyl éventuellement substitué soit par un groupe méthyle ou éthyle, soit par des groupes halogènes comme le chlore, le brome ou l'iode, soit par des groupes trifluorométhyl, trifluoroéthyl ou trifluoropropyl.

3. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 dans laquelle:

20

- R1 est un groupement hydroxyalkyle comprenant de 1 à 5 atomes de carbone, notamment les groupes hydroxymethyl, hydroxyethyl, hydroxypropyl, hydroxybutyl, hydroxypentyl, ces groupes hydroxyles pouvant éventuellement éthérifiés par substitution de l'atome 25 d'hydrogène par un groupe méthyl, ethyl, ou $-\text{Si}-(\text{CH}_3)_3$, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents l'un de l'autre et peuvent représenter un groupement hydrocarboné saturé propyl, isopropyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, éventuellement substitué par des halogènes comme le chlore, le 30 brome, l'iode ou des groupes trifluorométhyl, trifluoroéthyl, trifluoropropyl.

4. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 dans laquelle

- R1 représente une chaîne hydrocarbonée mono ou polyinsaturée du type propényl, propynyl, butényl, butynyl, butadiényl, pentényl, pentadiényl,

5 pentynyl, hexènyle, hexadiényle, hexynyl, isoprényle, et - R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent une chaîne alkyl linéaire ou ramifiée comportant de 1 à 20 enchaînements hydrocarbonés tel que methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridécyl, tetradécy, 10 pentadécy, hexadécy, heptadécy, octadécy, nonadécy, eicosyl, éventuellement substitués par un groupe methyl ou ethyl pouvant être lui-même substitué par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des groupes trifluoromethyl, trifluoroethyl, trifluoropropyl.

15 5. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 dans laquelle

- R1 représente un groupe methyl, methylethyl, propyl, butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridécyl, tetradécyl, pentadécyl, hexadécyl, heptadécyl, octadécyl, 20 nonadécyl, eicosyl, et

- R2 et R3 forment ensemble avec l'azote un hétérocycle azoté saturé comprenant 4 ou 5 atomes de carbone dans lequel un atome de carbone peut être remplacé par un atome de silicium, un atome d'oxygène ou un atome de soufre, ce cycle pouvant comporter en outre un substituant du type methyl, ethyl, hydroxymethyl, hydroxyethyl, methyl ethyl, hydroxypropyl, un groupe trifluoromethyl, un groupe trifluoroethyl, ou un groupe trimethylsilyl, trimethylsilyloxy.

25 6. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des

30 revendications 1 à 5 dans laquelle X représente une chaîne

hydrocarbonée saturée de préférence linéaire, et ayant de préférence entre 14 et 26, de préférence 14 et 22, par exemple 16 atomes de carbone.

7. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des 5 revendications 1 à 6 dans laquelle les deux têtes polaires sont identiques.

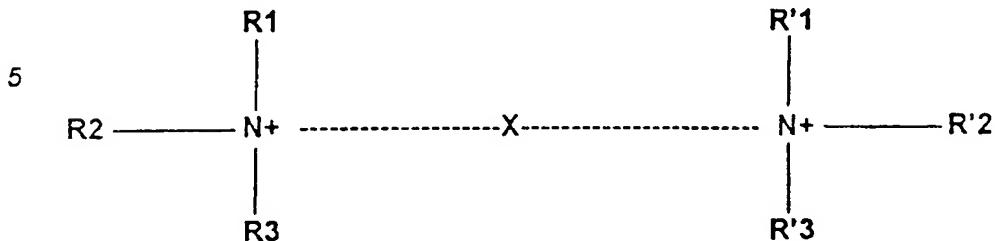
8. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que le principe actif est choisi parmi les composés suivants :

10 N,N'-dimethyl-N,N'-diethyl-N,N'-dipropyl-1,16-hexadecanediaminium, dibromure ;
N,N'-dimethyl-N,N'-diethyl-N,N'-dipropyl-1,20-eicosanediaminium, dibromure ;
N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,16-hexadecanediaminium dibromure ;
15 N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,18-octadecanediaminium dibromure ;
N,N'-dimethyl-N,N,N',N'-tetraethyl-1,21-heneicosanediaminium dibromure ;
- 1, 1'-(1, 1 4-tetradecanediyl) bis (1 -methylpyrrolidinium) dibromure ;
-1,1'-(1,16-hexadecanediyl) bis (1-methylpyrrolidinium) dibromure ;
-1,1'-(1,16-hexadecanediyl) bis (2-hydroxymethyl-1-methylpyrrolidinium 20 dibromure ;
N,N'-di-(2-hydroxyethyl) -N,N,N',N'-tetrapropyl-1,20-eicosanediaminium dibromure.

9. Composé pour utilisation comme agent thérapeutique caractérisé en 25 ce qu'il est défini par la formule générale telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10. Composé selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il est un agent anti-paludéen et/ou antibabésiose.

11. Utilisation d'un composé défini par la formule générale (I), pour l'obtention d'un médicament antipaludéen, ou antibabésiose :



10

dans laquelle:

- R1 représente un groupe hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone, et
- 15 - R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent indépendamment un groupe hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone éventuellement substitué soit par un groupe méthyle ou éthyle, soit par des groupes halogènes comme le chlore, le brome ou l'iode, soit par des
- 20 - groupes trifluorométhyl, trifluoroéthyl ou trifluoropropyl ;

ou

- R1 représente un groupement hydroxyalkyle comprenant de 1 à 5 atomes de carbone, les groupes hydroxyles pouvant être éventuellement éthérifiés
- 25 par substitution de l'atome d'hydrogène par un groupe methyl, ethyl, ou substitués par des dérivés silylés du type -Si-(CH₃)₃, et
- R2 et R3 sont identiques ou différents entre eux et représentent un groupe hydrocarboné saturé éventuellement substitué par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des groupes trifluoromethyl,
- 30 trifluoroethyl, trifluoropropyl ;

ou

- R1 représente un groupement hydrocarboné mono- ou polyinsaturé ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et
- 5 - R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent une chaîne alkyl linéaire ou ramifiée comportant de 1 à 20 enchaînements hydrocarbonés, éventuellement substitués par un motif methyl, un ethyl ou par des halogènes comme le chlore, le brome, l'iode ou des motifs trifluoromethyl, trifluoethyl, trifluoropropyl;

10

ou

- R1 représente un groupement hydrocarboné ayant de 1 à 20 atomes de carbone, et
- R2 et R3 forment ensemble avec l'azote un hétérocycle azoté saturé 15 comprenant 4 ou 5 atomes de carbone dans lequel un atome de carbone peut être remplacé par un atome de silicium, un atome d'oxygène ou un atome de soufre, ce cycle pouvant comporter en outre un substituant alkyle ayant de 1 à 3 atomes de carbone pouvant être lui-même hydroxyle, halogéné, ou silylé;

20

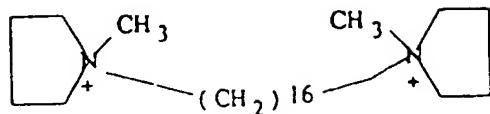
où R1', R2' et R3' ont la même définition que R1, R2 et R3 dans la formule (I),

et où X représente une chaîne hydrocarbonée saturée contenant des 25 groupements -CH₂- ou des groupements cycliques comportant éventuellement un substituant alkyle ayant 1 à 3 atomes de carbone, cet enchaînement hydrocarboné ayant entre 11 et 26 atomes de carbone.

12 . Utilisation d'un composé selon la revendication 11 caractérisé en ce 30 qu'il correspond au principe actif défini dans les revendications 1 à 10.

13. Composé ayant la formule :

5



14. Procédé pour la préparation d'une composition pharmaceutique
10 caractérisé en ce qu'un principe actif défini par la formule générale (1)
selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 12 est combiné avec
un excipient physiologiquement acceptable.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que le principe
15 actif est en outre combiné avec un additif conventionnel, tel qu'un agent
conservateur, un agent antioxydant ou un diluant.

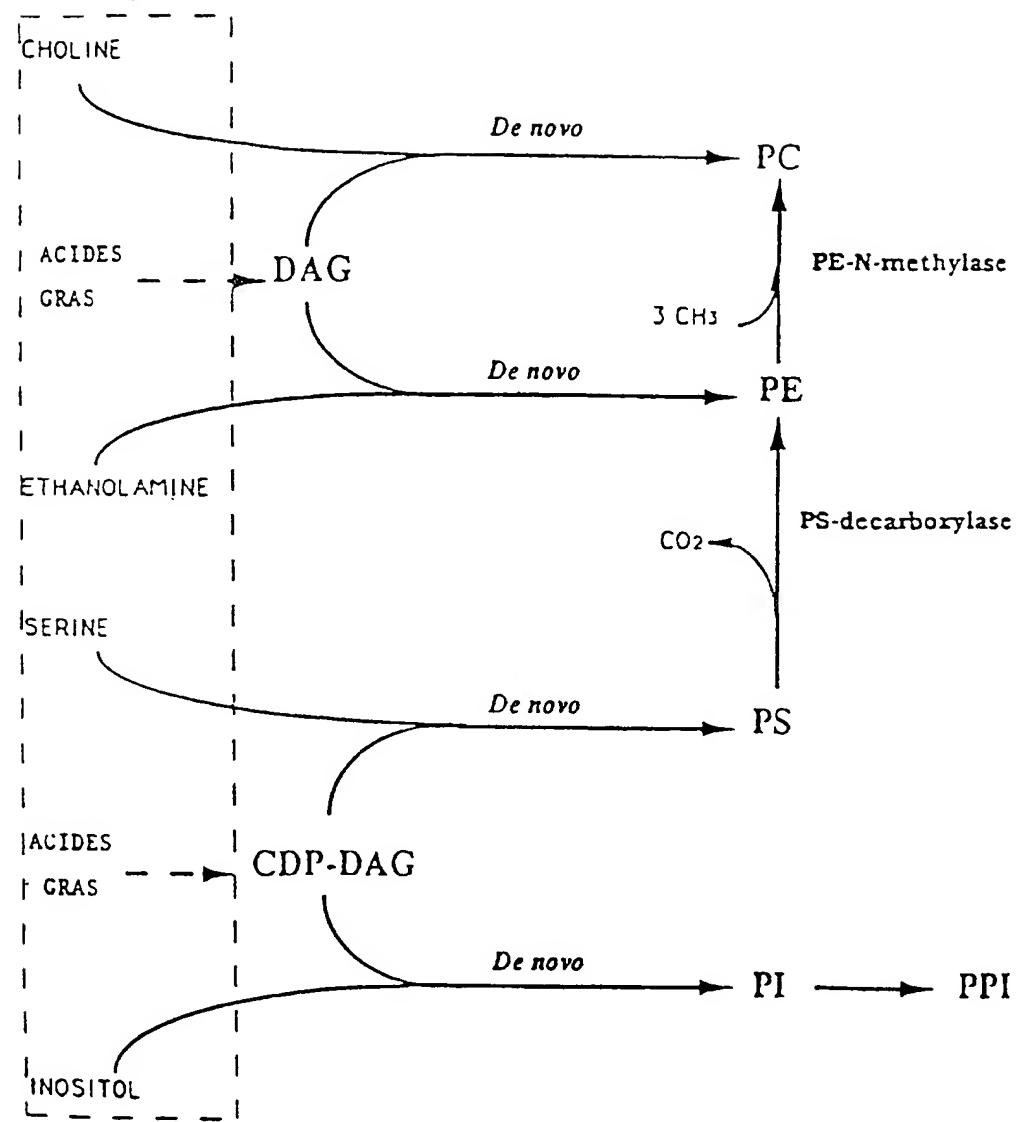
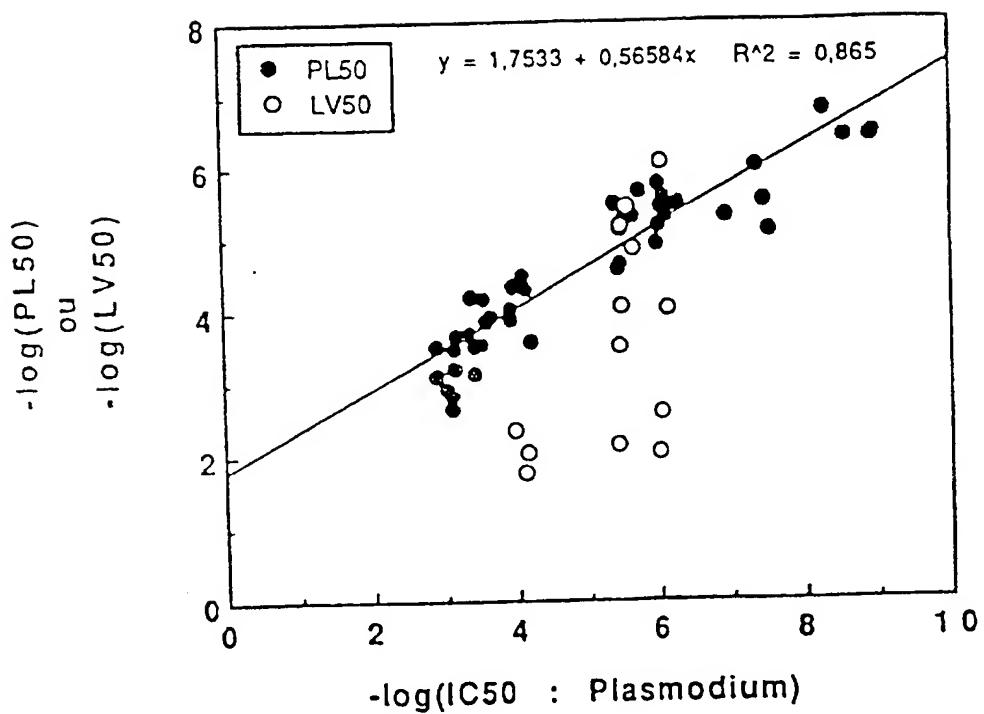


Figure 1

2/6

Figure 2



3/6

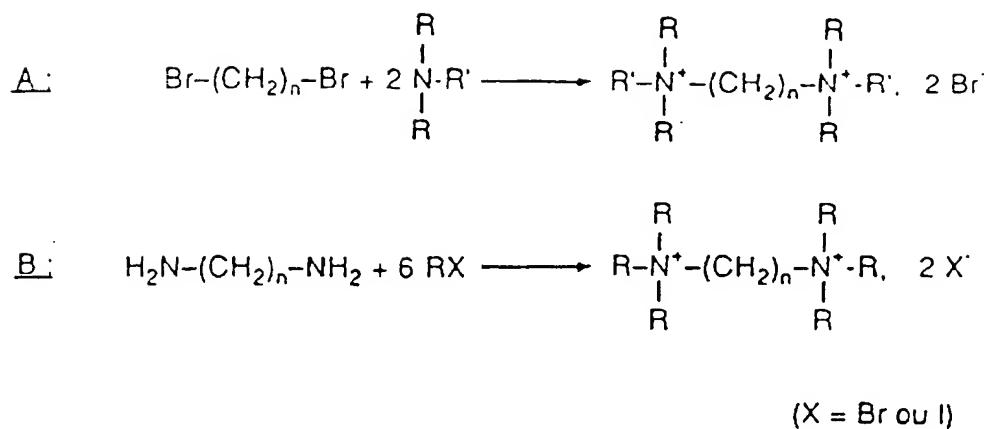


FIGURE 3

4/6

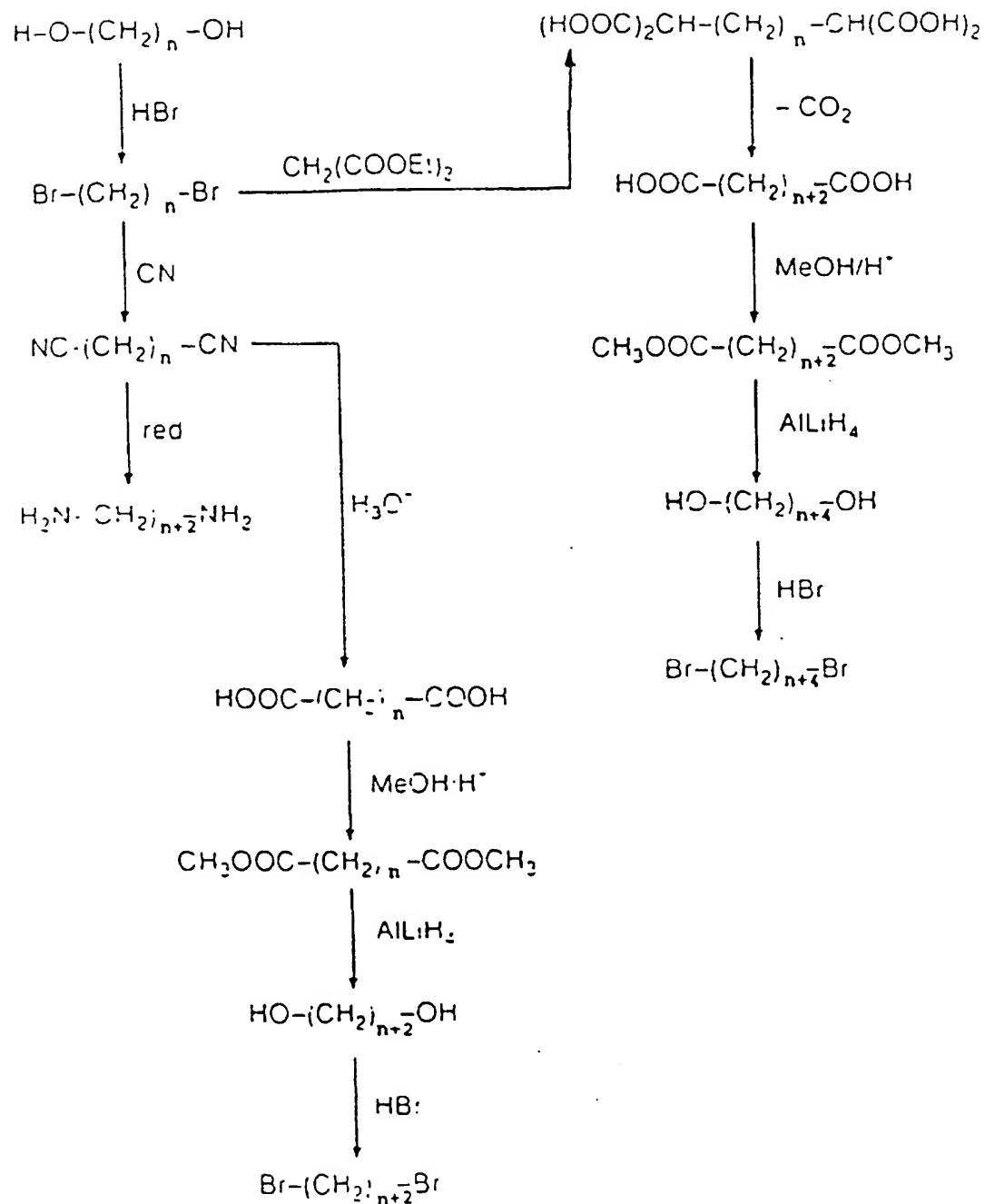


FIGURE 4

5/6

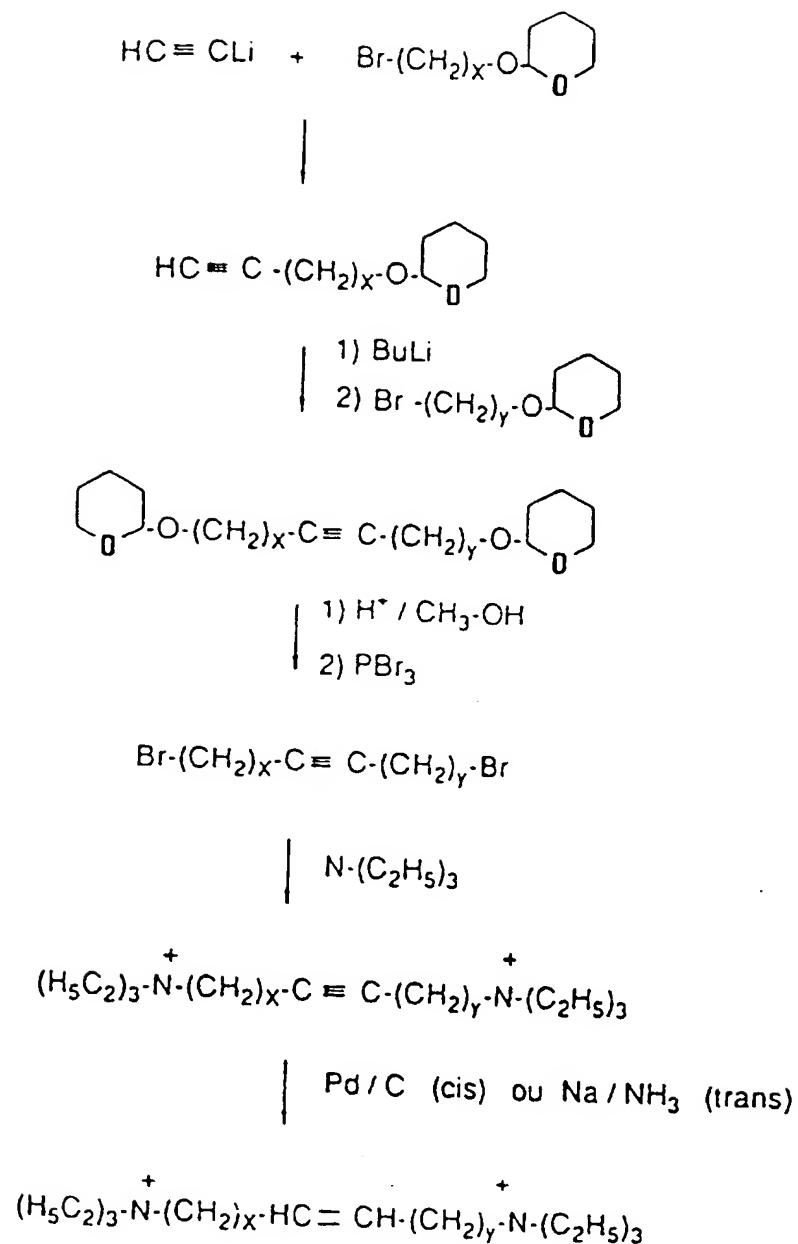


FIGURE 5

6/6

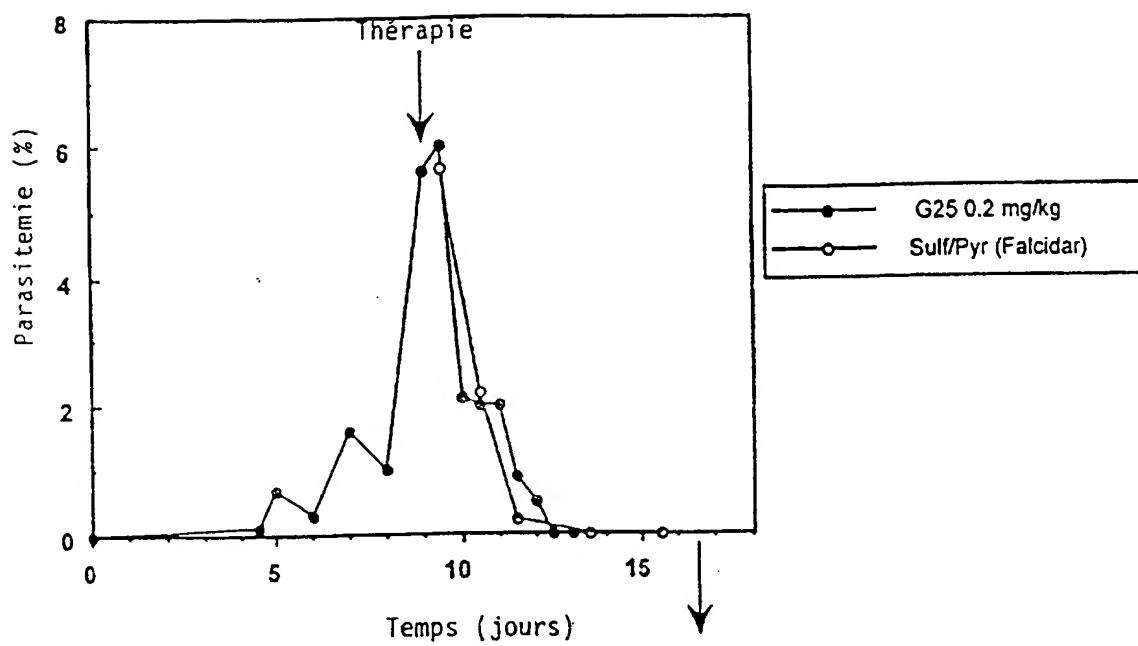


FIGURE 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 97/01336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/14 A61K31/40 A61K31/445 C07D295/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>M. L. ANCELIN ET AL.: "Inhibitors of choline transport into Plasmodium-infected erythrocytes are effective antiplasmodial compounds in vitro" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 34, no. 22, 1985, pages 4068-71, XP000646040 see the whole document</p> <p>---</p> <p>M. L. ANCELIN ET AL.: "Quaternary Ammonium Compounds efficiently inhibit Plasmodium falciparum growth in vitro by impairment of choline transport" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 29, no. 5, 1986, pages 814-20, XP000646037 see the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: right;">-/-</p>	1-15
A		1-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

16 September 1997

26.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (-31-70) 340-3016

Authorized officer

Sánchez García, J.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/01336

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. T. HOLDEN ET AL.: "Inhibition of high-affinity choline transport in rat striatal synaptosomes by alkyl biquaternary ammonium compounds" MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 11, no. 1, 1975, pages 19-27, XP000646446 see the whole document ---	1-15
A	WO 96 11910 A (VIRBAC LAB ;VIAL HENRI (FR); CALAS MICHELE (FR); BOURGUIGNON JEAN) 25 April 1996 -----	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01336

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9611910 A	25-04-96	FR 2725718 A AU 3749195 A EP 0785924 A	19-04-96 06-05-96 30-07-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la Recherche Internationale No
PCT/FR 97/01336

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K31/14 A61K31/40 A61K31/445 C07D295/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C07D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	M. L. ANCELIN ET AL.: "Inhibitors of choline transport into Plasmodium-infected erythrocytes are effective antiplasmodial compounds in vitro" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 34, no. 22, 1985, pages 4068-71, XP000646040 voir le document en entier ---	1-15
A	M. L. ANCELIN ET AL.: "Quaternary Ammonium Compounds efficiently inhibit Plasmodium falciparum growth in vitro by impairment of choline transport" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 29, no. 5, 1986, pages 814-20, XP000646037 voir le document en entier ---	1-15

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée
16 septembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26.09.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sánchez García, J.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der : Internationale No
PCT/FR 97/01336

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J. T. HOLDEN ET AL.: "Inhibition of high-affinity choline transport in rat striatal synaptosomes by alkyl biquaternary ammonium compounds" MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 11, no. 1, 1975, pages 19-27, XP000646446 voir le document en entier --- WO 96 11910 A (VIRBAC LAB ;VIAL HENRI (FR); CALAS MICHELE (FR); BOURGUIGNON JEAN) 25 avril 1996 -----	1-15
1		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den. Internationale No

PCT/FR 97/01336

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9611910 A	25-04-96	FR 2725718 A AU 3749195 A EP 0785924 A	19-04-96 06-05-96 30-07-97